

TSC sans Cyclosérine/Gélose (Tryptone-Sulfite-Cyclosérine)

355-4419
356-9644

DOMAINE D'APPLICATION

Milieu gélosé de base utilisé pour la recherche et le dénombrement des micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs dans les produits alimentaires et dans tous les types d'eau.

REFERENCE(S) NORMATIVE(S)

MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS

- **NF EN ISO 15213 (Septembre 2003)** : Méthode horizontale pour le dénombrement des bactéries sulfito-réductrices se développant en conditions anaérobies
- **NF EN ISO 7937 (Février 2005)** : Méthode horizontale pour le dénombrement de *Clostridium perfringens* - Méthode de comptage des colonies

EAUX

- **ISO/DIS 6461-2 (Juin 2005)** : Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des *Clostridium perfringens* - Part 2 : Méthode par filtration sur membrane (Révision ISO 6461-2:1986)
- **NF EN 26461-2 (Juillet 1993)** : Qualité de l'eau - Recherche et Dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfito - réducteurs (*Clostridia*) - Partie 2 : Méthode par filtration sur membrane
- **NF T90-415 (Octobre 1985)** : Essais des eaux - Recherche et dénombrement des spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices et de *Clostridium* sulfito-réducteurs - Méthode générale par incorporation en gélose en tubes profonds
- **Journal Officiel des Communautés européennes - Directives 98/83/CE du Conseil du 3 novembre 1998** relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine - Annexe III : Spécifications pour l'analyse des paramètres
- **NF T90-461/A2 (Mai 2007)** : Qualité de l'eau - Microbiologie - Contrôle qualité des milieux de culture

PRINCIPE

Le principe du milieu repose sur la capacité des *Clostridium* à réduire les sulfites en sulfures qui, en présence de citrate de fer, forment un précipité noir de sulfure de fer autour des

colonies. Le milieu est rendu inhibiteur vis-à-vis des autres bactéries par la D-cyclosérine. L'incubation à 46 °C renforce la sélectivité du milieu vis-à-vis de *Clostridium perfringens*.

PRESENTATION

Milieu de base

- Prêt à l'emploi
100 ml x 6 flacons **code 355-4419**
- Déshydraté
500 g **code 356-9644**

CONSERVATION/VALIDITE/LOT

- Déshydraté : + 15 - 25°C, flacon soigneusement fermé dans un endroit frais et sec
- Prêt à l'emploi : + 2 - 8°C
- La date de péremption et le numéro du lot sont indiqués sur le conditionnement

FORMULE THEORIQUE

Peptone	15 g
Peptone de soja	5 g
Extrait de levure	5 g
Na ₂ S ₂ O ₅	1 g
Citrate de fer III ammoniacal	1 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH (25°C) final = 7,6 ± 0,2	

AUTRE(S) PRODUIT(S) NECESSAIRE(S) (NON FOURNI(S))

- Eau distillée
- **Solution à 4 % de D-cyclosérine** stérilisée par filtration (ISO/DIS 6461-2 et ISO 7937)

MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI (liste non exhaustive)

- Balance
- Sacs de pesée stériles
- Broyeur
- Plaque chauffante
- Agitateur-homogénéisateur
- Tubes à essais (16 x 160 mm) avec bouchons autoclavables
- Flacons de 150 ml en Pyrex avec bouchons autoclavables
- Boîtes de Petri stériles (Ø = 90 ou 55 mm)
- Pipettes stériles (1 ml,...)
- Matériel nécessaire pour travailler en anaérobiose (Jarre, catalyseur,...)
- Bains-marie avec une précision de ± 1°C

TSC sans Cyclosérine/Gélose

(Tryptone-Sulfite-Cyclosérine)

- Etuves ou enceintes thermostatées avec une précision de $\pm 1^\circ\text{C}$
- Autoclave
- Tout matériel courant d'un laboratoire

PREPARATION DU MILIEU DESHYDRATE

- Milieu de base

Toujours agiter avant chaque utilisation.

Dissoudre 42 grammes de poudre dans un litre d'eau distillée. Attendre 5 minutes et bien mélanger jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène. Chauffer lentement, en agitant fréquemment, puis porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.

Répartir en tubes ou en flacons (100 ml) et stériliser à l'autoclave à $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 15 minutes.

Taux de reconstitution : 42 g/l

500 grammes de poudre permettent de réaliser 11,9 litres de milieu de base.

- Milieu de base + D-cyclosérine (pour ISO/DIS 6461-2 et ISO 7937) : Au moment de l'emploi, ajouter à 100 ml de milieu de base fondu puis refroidi à 44°C à 49°C selon les normes : 1 ml d'une solution à 4 % de D-cyclosérine stérilisée par filtration.

- Milieu de base + cyclosérine + jaune d'œuf

La formule précédente peut être additionnée de jaune d'œuf : 8 ml d'une solution de jaune d'œuf à 50 % en eau physiologique pour 100 ml de la préparation précédente.

Dans ce cas, les dilutions décimales du produit sont étalées à raison de 0,1 ml par boîte.

PROTOCOLE

- **Préparation des échantillons**

A effectuer conformément à la norme du produit concerné.

- **Ensemencement et incubation**

Normes alimentaires :

Ensemencement en masse : Placer 1 ml de la solution-mère ou de chaque dilution décimale dans deux boîtes de Petri (ou deux tubes) et couler 12 à 15 ml de gélose fondue et refroidie à une température de 44°C à 47°C . Homogénéiser et laisser solidifier. Couler une autre couche de gélose de 5 ml environ. Laisser sécher. Incuber à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 20 ± 2 h pour l'ISO 7937 ; 24 à 48 h pour l'ISO 15213 en anaérobiose.

Dans le cadre de l'ISO 15213, si l'on suspecte la présence de **bactéries thermophiles**, préparer une deuxième série de boîtes de Petri. Incuber à $50 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 24 à 48 h en anaérobiose.

Normes des eaux :

- Ensemencement en tube : (NF T90-415)

Mélanger un tube de prise d'essai et un tube de milieu fondu (20 ml) et refroidi à 44°C à 49°C selon les normes. Incuber à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 24 et/ou 48 h.

- Méthode par filtration sur membrane : (NF EN 26461-2)

Filtrer une quantité d'échantillon appropriée en évitant la formation de bulles entre le filtre et le dispositif de filtration.

Récupérer la membrane et la déposer face supérieure vers le haut dans une boîte de Petri, en évitant la formation de bulles d'air sous le filtre. Couler environ 18 ml de gélose TSC sans D-cyclosérine à une température de 44°C à 49°C selon la norme. Laisser solidifier à température ambiante sur une surface fraîche et horizontale.

Incuber en anaérobiose à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 20 ± 4 h et 44 ± 4 h.

- Méthode par filtration sur membrane : (selon ISO/DIS 6461-2*)

Filtrer une quantité d'échantillon appropriée en évitant la formation de bulles entre le filtre et le dispositif de filtration.

Récupérer la membrane et la déposer quadrillage vers le haut sur une boîte de gélose TSC avec D-cyclosérine, en évitant la formation de bulles d'air sous le filtre.

Incuber les Petri en anaérobiose à $44 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 21 ± 3 h.

*N.B. : * la norme ISO/DIS 6461-2 est au stade de projet. Elle doit être publiée et acceptée au niveau national pour entrer en vigueur.*

LECTURE ET INTERPRETATION

Les colonies d'anaérobies sulfite-réducteurs sont noires avec un halo noir. Le dénombrement ne se fera que sur les boîtes où les colonies seront distinctes les unes des autres.

Pour le dénombrement spécifique de *C. perfringens*, des tests complémentaires sont à réaliser à partir d'un nombre représentatif de colonies typiques.

Remarque : En présence de jaune d'œuf dans le milieu, les colonies de *C. perfringens* sont noires et habituellement entourées d'une auréole opaque dûe à la lécithinase de cette bactérie.

PRECAUTION D'EMPLOI

- Ne pas ajouter la D-cyclosérine dans un milieu de base à une température supérieure à 49°C .

TSC sans Cyclosérine/Gélose (Tryptone-Sulfite-Cyclosérine)

- Ne pas agiter violemment le milieu régénéré pour éviter toute ré-oxygénation de celui-ci.
- Respecter les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

PERFORMANCES / CONTROLE QUALITE DU TEST

Les performances culturales du milieu TSC sont contrôlées à l'aide des souches suivantes :

MICRO-ORGANISMES	Culture en 20 h à 37°C (en anaérobiose)	
	Aspect	PR *
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	Colonies noires	≥ 0.7
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 12916	Colonies noires	≥ 0.7
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Pas de croissance	-

* PR = Nombre total de colonies obtenu sur 2 boîtes de milieu TSC/ Nombre total de colonies obtenues sur 2 boîtes de gélose TCS.

MICRO-ORGANISMES	Culture en 48 h à 37°C (en anaérobiose)
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	Colonies noires
<i>Escherichia coli</i> RIVM WR1**	Pas de croissance

** Equivalente à NCTC 13167

CONTROLE QUALITE DU FABRICANT

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis. Chaque lot du produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et il n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation.

La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée.

MOTS CLES

TCS / Spores / Anaérobies Sulfite-Réducteur / *Clostridium perfringens* / Produits alimentaires / Eaux / Recherche / Dénombrement / Filtration / NPP / Milieu.

BIBLIOGRAPHIE

- HAUSCHILD A.H.W. and HILSEIMER R. (1974): Evaluation and modifications of media for enumeration of *Clostridium perfringens* *Applied Microbiology* **27**: 78-82.
- HARMON S.M., KAUTTER D.A. and PEELER J.T. (1971): Improved medium for enumeration of *Clostridium perfringens*. *Applied Microbiology* **22**: 688-692.